

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-504111

(43)公表日 平成9年(1997)4月22日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
G 01 N 33/566		0276-2J	G 01 N 33/566	
C 12 N 15/09	Z NA	9637-4B	C 12 P 21/02	C
C 12 P 21/02		7823-4B	C 12 Q 1/00	Z
C 12 Q 1/00		0276-2J	G 01 N 33/53	A
G 01 N 33/53		0276-2J		E

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 43 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号	特願平7-518075
(86) (22)出願日	平成6年(1994)12月29日
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)6月13日
(86)国際出願番号	PCT/US94/14426
(87)国際公開番号	WO95/18380
(87)国際公開日	平成7年(1995)7月6日
(31)優先権主張番号	08/177,740
(32)優先日	1993年12月30日
(33)優先権主張国	米国(US)
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, J P

(71)出願人	ザ ソールク インスチチュート フォア バイオロジカル スタディズ アメリカ合衆国92037 カリフォルニア州, ラ ジョラ, ノース トレイ バインズ ロード 10010
(72)発明者	エバンズ, ロナルド エム. アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア 州ラ ジョラ, ラ ジョラ シーニック ドライブ ノース 8615
(74)代理人	弁理士 浅村 翔 (外3名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 G A L 4 - 受容体構築体の新規な使用

(57)【要約】

本発明によれば、酵母GAL4タンパク質のDNA結合ドメインが導入されたステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーの少なくともリガンド結合部位からなるキメラ受容体が機能性ホモダイマーを形成できることが発見された。このようなホモダイマーは、たとえばステロイド/甲状腺ホルモンスーパーファミリー受容体のオーファンメンバーのリガンドを決定するためのアッセイ、共通のリガンドに応答する複数個の受容体の中から特定のステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物の同定等に有用である。

## 【特許請求の範囲】

1. ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのオーファンメンバーに対するリガンドもしくはリガンド前駆体を決定する方法において，

上記オーファンメンバーの修飾型を含む細胞をそのオーファンメンバーに対する推定リガンドと接触させ（この場合，上記オーファンメンバーの上記修飾型はGAL4のDNA結合ドメインを上記オーファンメンバー内に導入することによって生成され，また上記細胞はレポーター遺伝子に操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する），ついで，

レポーター遺伝子産物の発現をモニターする，  
ことからなる方法.

2. GAL4のDNA結合ドメインはGAL4のアミノ酸残基1～147からなる「請求項1」に記載の方法.

3. GAL4のDNA結合ドメインはオーファンメンバーのアミノ末端に導入される「請求項1」に記載の方法.

4. GAL4のDNA結合ドメインはオーファンメンバーのDNA結合ドメインを置換する「請求項1」に記載の方法.

5. 共通のリガンドに応答する複数個のステロイド／甲状腺ホルモン受容体の中から1つの特異的ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する方法において，

GAL4のDNA結合ドメインを上記複数個の受容体タンパク質それぞれに導入して，複数個の修飾受容体タンパク質を生成させ，

上記の修飾受容体タンパク質の1つを含有する細胞を上記修飾受容体タンパク質に対する推定選択的リガンドと接触させ（この場合，上記細胞はレポーター遺伝子に操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する），

レポーター遺伝子産物の発現をモニターし，ついで，  
上記複数個の修飾受容体タンパク質のすべてのメンバについて個々に上記接觸が行われるまで，上記接觸およびモニター工程を異なる修飾受容体タンパク質

で反復し、その後、

共通のリガンドに応答する上記複数個の受容体の中から1つの特異的ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する、ことからなる方法。

6. 上記複数個の受容体タンパク質は共通のリガンドに応答する受容体の多重サブタイプからなる「請求項5」に記載の方法。

7. G A L 4 の D N A 結合ドメインは G A L 4 の少なくとも最初の74個のアミノ末端アミノ酸残基からなる「請求項5」に記載の方法。

8. G A L 4 の D N A 結合ドメインは受容体タンパク質のアミノ末端に導入される「請求項5」に記載の方法。

9. G A L 4 の D N A 結合ドメインは受容体タンパク質の D N A 結合ドメインを置換する「請求項5」に記載の方法。

10. 上記修飾受容体タンパク質は本質的に G A L 4 のアミノ酸残基1～147と上記ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質のリガンド結合ドメインからなる「請求項5」に記載の方法。

11. ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質のアンタゴニストをスクリーニングする方法において、

(i) ホルモン受容体アゴニストの転写活性化活性を阻害する能力の測定が求められている少なくとも1つの化合物の濃度を上昇させ、および

(ii) 任意に、上記ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質もしくはその機能性修飾型に対する少なくとも1つのアゴニスト、

を含有する試験細胞を培養し〔この場合、上記試験細胞は(i) G A L 4 の D N A 結合ドメインを含有するステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質の修飾型またはその機能性修飾型を発現する外因性 D N A 、および(ii) レポーター遺伝子に操作性に連結された G A L 4 レスポンスエレメントを含有する〕、ついで

,

ホルモン受容体アゴニストによる転写の活性化を阻害する上記化合物の能力を指示する上記培養培地中の上記化合物の濃度の関数としての上記細胞内における上記レポーター遺伝子の転写の証明をアッセイする、

ことからなる方法.

12. ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質をホモダイマー形成可能にする方法において、GAL4のDNA結合ドメインを上記受容体タンパク質中に導入することからなる方法.

13. GAL4のDNA結合ドメインはGAL4の少なくとも最初の74個のアミノ末端アミノ酸残基からなる「請求項12」に記載の方法.

14. GAL4のDNA結合ドメインは受容体タンパク質のアミノ末端に導入される「請求項12」に記載の方法.

15. GAL4のDNA結合ドメインは受容体タンパク質のDNA結合ドメインを置換する「請求項12」に記載の方法.

16. 上記修飾受容体タンパク質は本質的にGAL4のアミノ酸残基1～147と上記ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質のリガンド結合ドメインからなる「請求項12」に記載の方法.

17. 細胞内受容体に対するリガンドもしくはリガンド前駆体に変換できるか、または第二の化合物の、細胞内受容体のリガンドもしくはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを行うことができるか、または細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができることを特徴とする生物活性化合物を同定する方法において、

(1) 細胞または細部分画を上記生物活性化合物と生理学的条件下において接触させ、

(2) 細胞、細胞分画および／または上記接触が行われた培地を分画化し、ついで

(3) 上記各分画を、酵母GAL4タンパク質のDNA結合ドメインが導入されたステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーからなるキメラ受容体をコードするDNA、およびレポーターコードDNAに操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と各分画を培養する機能アッセイに付し、レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体－リガンド複合体の存在を測定する、

ことからなる方法.

## 18. 生物活性化合物の、

- (A) 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体、または、
- (B) 第二の化合物の、細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを促進する種、または、
- (C) 細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができる種、  
への変換を促進できる細胞系を同定する方法において、
  - (1) 細胞をその細胞の生存度の維持に適当な条件下に生物活性化合物と接触させ、
  - (2) 細胞および細胞が保持された培地を分画化し、
  - (3) 上記各分画を、酵母G A L 4 タンパク質のDNA結合ドメインが導入されたステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバ－からなるキメラ受容体をコードするDNA、およびレポーターコードDNAに操作性に連結されたG A L 4 レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と各分画を培養する機能アッセイに付し、レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体－リガンド複合体の存在を測定し、
  - (4) 上記生物活性化合物の、上記機能バイオアッセイにおいて機能性な産物への変換を促進する細胞系を同定する、  
ことからなる方法。

## 19. 生物活性化合物の、

- (A) 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体、または、
- (B) 第二の化合物の、細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを促進する種、または、
- (C) 細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができる種、  
への変換を促進できる酵素または非酵素活性を同定する方法において、
  - (1) 生物活性化合物を所望の変換を促進するために適当な条件に付し、
  - (2) 工程(1)の反応生成物を、酵母G A L 4 タンパク質のDNA結合ドメインが導入されたステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミ

リーのメンバーからなるキメラ受容体をコードするDNA, およびレポーターコードDNAに操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と各分画を培養する機能バイオアッセイに付し, レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体ーリガンド複合体の存在を決定し,

(3) 上記生物活性化合物の, 上記機能アッセイにおいて所望の活性を与える機能性の産物への変換を促進する条件を同定する,  
ことからなる方法.

## 【発明の詳細な説明】

### G A L 4 - 受容体構築体の新規な使用

#### 謝 辞

本発明は米国立衛生研究所によって付与された助成金HD27183号による政府援助によって行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

#### 発明の分野

本発明は細胞内受容体およびそれらのリガンドに関する。特定の態様においては、本発明は細胞内受容体に対するリガンド（またはリガンド前駆体）として機能する化合物の同定方法に関する。他の態様においては、本発明は1つの共通のリガンドに応答する複数個の受容体の中から特定の受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する方法に関する。さらに別の態様においては、本発明は新規なキメラ細胞内受容体およびそれらの使用に関する。

#### 発明の背景

真核生物の分子生物学における中心的な課題は、依然として特定の遺伝子制御を誘発する分子および機構の解明である。この課題への科学的な取り組みの一部として、多くの研究が特定の遺伝子制御を誘発できるリガンド（すなわち外因性誘導因子）を同定する努力に向けられてきた。

遺伝子制御の細目については、多くがなお今後の研究に待たねばならないが、リガンドが細胞内受容体およびホルモンレスポンスエレメント（H R E）として知られている部分的DNA配列を包含する細胞内成分と共同して働くことにより遺伝子転写を修飾していることは知られている。

ステロイド／甲状腺ホルモンスーパーファミリー受容体のメンバーがさらに同定されるに従い、このような新たに発見された受容体に対する外因性の誘導因子〔すなわち、天然に存在する（または合成の）誘導因子〕の探索が、遺伝子制御の細目を突き止める努力の重要な部分となってきたのである。

細胞内受容体と直接または間接的に相互作用し、それによってホルモン応答性遺伝子の転写に影響する化合物が同定されれば、たとえば、治療的応用に重大な

価値が考えられる。

更なる新規な細胞内受容体（すなわち、ステロイド／甲状腺ホルモンスーパー・ファミリー受容体のメンバー）の同定が続いている。しかしながら、これらの新規な受容体に対する一次リガンドは、容易には同定できない場合が多い。したがって、このような受容体に対するリガンドの迅速な同定方法があれば、大いに価値がある。

リガンドが同定されている細胞内受容体の中には、1つの共通のリガンドに応答する受容体がいくつかある〔たとえば、レチノイン酸受容体（RAR）とレチノイドX受容体（RXR）はいずれもレチノイン酸の存在に応答し、グルココルチコイド受容体（GR）と鉱質コルチコイド受容体（MR）はともにグルココルチコイド等の存在に応答するなど〕。1つの共通のリガンドに応答するすべての受容体サブタイプではなく、その1つのみによって誘導される過程を修飾するため、単一のサブタイプに選択的なリガンドを発見する努力に多大な労力が注がれてきた。しかしながら、数種の異なる受容体サブタイプに対する単一リガンドの作用間の差を識別することは難しい。したがって、単一のサブタイプに選択的な化合物の同定方法があれば、これもきわめて有用である。

最近、一部の細胞内受容体はステロイド／甲状腺ホルモンスーパー・ファミリー受容体の他のメンバーと会合した場合（すなわち、ヘテロダイマーとして）にのみ転写制御に機能することが発見された。しかしながら、特定の受容体によって影響される生理学的過程が明らかにされるまでは、オーファン受容体がホモダイマーとして機能するのかまたはパートナーを必要とする（機能性ヘテロダイマーを形成できるように）のかを決定することは不可能である。したがってオーファン受容体（すなわち、リガンドがまだ同定されていない受容体）の特性解明を、そのオーファン受容体が機能性受容体の生成にパートナーを必要とするかどうかを決定することなく単純化できる手段があれば、それもきわめて有用である。

本発明の理解および実施に役立つ他の情報は、共通して譲渡された米国特許第5,071,773号および4,981,784号、ならびに1989年3月17日付出願の米国特許出願第325,240号、1989年6月22日付出願の第370,407号および1989年11月16日付出願の第438,757号に見出すことができる。それらはすべて、引用により、その

全体が本明細書に導入される。

#### 発明の簡単な説明

本発明によれば、本発明者らは、ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーの内部に酵母G A L 4タンパク質のD N A結合ドメインが組込まれてなるキメラ受容体が機能性ホモダイマーを形成できることを発見した。このようなホモダイマーは、たとえば、ステロイド／甲状腺ホルモンスーパーファミリー受容体のオーファンメンバーに対するリガンドを決定するためのアッセイにおいて、1つの共通リガンドに応答する複数個の受容体の中から特定のステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定するためなどに有用である。

このようなアッセイは、適當なリガンドの存在によって誘発される応答系がアッセイに使用される細胞に対して内因性ではないことから、広い動的範囲ときわめて低いバックグラウンドシグナルを示す。応答は、試験細胞中に存在する可能性がある内因性受容体からの競合ではなく、本発明のキメラ受容体が活性化される場合にのみ得られる。

本発明の他の実施態様によれば、細胞内受容体に対するリガンドもしくはリガンド前駆体に変換可能な化合物、または非ーリガンド活性化経路を介して受容体を誘導できる他の化合物の同定方法が提供される。本発明のさらに他の実施態様によれば、適當な前駆体化合物を細胞内受容体に対するリガンド（または非ーリガンド活性化経路を介して受容体を誘導できる他の化合物）に変換できる化合物（たとえば酵素）の同定方法が提供される。本発明のさらに他の実施態様によれば、上述の変換を促進することができる細胞系（またはその活性分画）の同定方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1はG A L 4-受容体融合タンパク質の調製に使用されるベクターp C M X-G A L 4のG A L 4コード部分の制限地図である。

図2は配列番号：4に記載するリンカーの制限地図である。

図3は、全トランスレチノイン酸の存在下における各種h R A R  $\alpha$ 構築体の用量反応曲線である。図中、◇は非修飾h R A R  $\alpha$ 、◆はキメラ受容体G R R（す

なわち、アミノ末端ドメインはグルココルチコイド受容体に由来し、DNAおよびリガンド結合ドメインはRARに由来するキメラ受容体），□はキメラ受容体GGR（すなわち、アミノ末端ドメインおよびDNA結合ドメインはGRに由来し、リガンド結合ドメインはRARに由来するキメラ受容体），■はGAL4-hRAR $\alpha$ を表す。

#### 発明の詳細な説明

本発明によれば、ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのオーファンメンバーに対するリガンドまたはリガンド前駆体を決定する方法において、

上記オーファンメンバーの修飾型を含有する細胞をそのオーファンメンバーに対する推定リガンドと接触させ（この場合、上記オーファンメンバーの上記修飾型はGAL4のDNA結合ドメインを上記オーファンメンバー内に導入することにより作成され、また上記細胞はレポーター遺伝子に操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する），ついで

レポーター遺伝子産物の発現をモニターする、  
ことからなる方法が提供される。

本発明の実施に際して使用される修飾受容体には所望により、1または2以上の外因性トランスアクティベーションドメイン、たとえば米国特許第5,217,867号に記載されている $\tau_1$ または $\tau_2$ トランスアクティベーションドメインを含有させてもよい。この米国特許は引用によりその全体が本明細書に導入される。

本発明のアッセイ法は、上記オーファン受容体に対するレスポンスエレメントがまだ同定されていない場合および／またはインビボにおいてホモダイマーもしくはヘテロダイマーとして機能する上記受容体の能力が未知な場合、とくに有用である。

すなわち、本発明の他の実施態様では、ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質をホモダイマー形成可能にする方法において、上記受容体タンパク質にGAL4のDNA結合ドメインを導入することからなる方法が提供される。

本明細書中で使用される「ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバー（すなわち、細胞内受容体）に対するリガンドまたは

「リガンド前駆体」の語は、（その非修飾型においてまたはその「活性」型への変換後）細胞の内部で受容体タンパク質に結合し、それによってリガンド／受容体複合体を創製し、その結果適切なホルモンレスポンスエレメントを活性化することができる物質または化合物を意味する。リガンドはしたがって、ホルモンレスポンスエレメントの制御下に維持される遺伝子の遺伝子転写を修飾する働きがある化合物であり、ホルモン、増殖物質、増殖を調節する非ホルモン物質等が含まれる。リガンドにはステロイドまたはステロイド様ホルモン、レチノイド、甲状腺ホルモン、医薬的に活性な化合物等が含まれる。個々のリガンドは多数の受容体に結合する能力をもつ場合がある。

したがって、本明細書中で使用される「推定リガンド」の語は、関心のあるオーファン受容体に結合してこのようなオーファン受容体によって認識されるレスポンスエレメントの制御下に維持される遺伝子の転写を修飾する能力をもつことが想定される化合物、たとえばステロイドまたはステロイド様ホルモン、医薬的に活性な化合物等を意味する。

既知のリガンドの例としては、全トランスレチノイン酸（レチノイン酸受容体に対するリガンド）、9-シス-レチノイン酸（レチノイドX受容体に対するリガンド）、デキサメサゾン（グルココルチコイド受容体に対するリガンド）、甲状腺ホルモン（甲状腺ホルモン受容体に対するリガンド）、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>（ビタミンD<sub>3</sub>受容体に対するリガンド）等がある。

既知のリガンド前駆体の例には、全トランスレチノイン酸（これは9-シス-レチノイン酸に変換できる）、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>（1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>に変換できる）、 $\beta$ -カロテン、生物活性脂質（たとえば、リノール酸またはアラキドン酸のような脂肪酸）等が含まれる。

本明細書中で使用される「ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバー」（「核受容体」または「細胞内受容体」としても知られる）の語は、リガンド依存性転写因子として働くホルモン結合タンパク質を意味する。特異的なリガンドがまだ同定されていないステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーは本明細書においては「オーファン受容体」と呼ばれる。これらのホルモン結合タンパク質は特定のDNA配

列に結合する固有の能力をもっている。結合後、リガンド／オーファン受容体複合体は、標的遺伝子（すなわち、特定のDNA配列と会合する遺伝子）の転写活性を調整する機能を果たすことになる。

受容体「サブタイプ」および受容体「クラス」の語を区別しておくことは有用である。たとえば、レチノイド応答性受容体は、すべてがレチノイド化合物に応答性である受容体の「クラス」を構成する。同様に、甲状腺ホルモン受容体は甲状腺ホルモンに応答性の受容体の「クラス」を構成する。各クラスは多様なサブタイプ、すなわち異なる組織分布、ネイティブリガンドに対する異なる親和性、ネイティブリガンドと接触した場合の活性化の異なる性質などを有するクラスの特定のメンバーに分割できる。

受容体の一部のクラスは、明らかに異なるタイプの受容体のサブファミリーを包含する。すなわち、たとえばレチノイドクラスの受容体はレチノイン酸受容体（RAR）およびレチノイドX受容体（RXR）の両者を包含するが、これらの2つの異なるサブファミリーには明瞭な差異がある。たとえば、RARサブファミリーの各メンバーは特定の第一のホルモンレスポンスエレメント（HRE）に応答し、またRXRサブファミリーの各メンバーは特定の第二のHRE（第一のHREとは明瞭に異なる）に応答する。したがって、本発明の一態様によれば、1つの共通リガンドに応答する複数個の受容体（すなわち、同一サブファミリーの異なるサブタイプ、または同一クラスのメンバーであるがサブファミリーは異なる）の中から特定のステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する方法において、

GAL4のDNA結合ドメインを上記複数個の受容体タンパク質それぞれの内部に導入して、複数個の修飾受容体タンパク質を生成させ、

上記修飾受容体タンパク質の一つを含有する細胞を上記修飾受容体タンパク質に対する推定選択的リガンドと接触させ（この場合、上記細胞はレポーター遺伝子と操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する）、

レポーター遺伝子産物の発現をモニターし、ついで、

上記複数個の修飾受容体タンパク質のすべてのメンバーについて個々に上記接触が行われるまで、他の修飾受容体タンパク質との上記接触およびモニター工程

を反復し、その後、

1つの共通リガンドに対して応答する上記複数個の受容体の中から1つの特定のステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する、ことからなる方法が提供される。

1つの共通リガンドに応答する受容体は多数あり、したがって上記の方法によって検討される複数個の受容体は1つの共通リガンドに応答する受容体の多重サブタイプ、たとえばRARの各種サブタイプおよび／またはRXRの各種サブタイプ、PPARの各種サブタイプ、COUPの各種サブタイプ等から選択することができる。

このような化合物は、たとえばステロイドまたはステロイド様ホルモン応答性の疾患状態の処置に有用である。本明細書において用いられる「ステロイドまたはステロイド様ホルモン応答性疾患状態」の表現は、

(i) 通常ステロイドまたはステロイド様ホルモンの発現制御には支配されない遺伝子産物（または遺伝子産物の部分）が、転座により、ステロイドまたはステロイド様ホルモン応答性配列の制御下に置かれている疾患状態、または

(ii) 第一のステロイドまたはステロイド様ホルモンによるステロイドまたはステロイド様ホルモンの発現制御に支配されている第一の遺伝子産物（または遺伝子産物の部分）が転座により、第二のステロイドまたはステロイド様ホルモン応答性配列の制御下に置かれている疾患状態、または

(iii) 通常ステロイドまたはステロイド様ホルモンの発現制御に支配されている遺伝子産物（または遺伝子産物の部分）の異常遺伝子産物の発現に関連する疾患状態、または

(iv) 通常その発現がステロイドまたはステロイド様ホルモンの発現制御下に維持されている遺伝子産物の異常レベルの発現に関連する疾患状態、または

(v) 通常その存在がステロイドまたはステロイド様ホルモンの発現制御下に維持されている受容体の異常レベルに関連する疾患状態、または

(vi) 通常その存在がステロイドまたはステロイド様ホルモンの発現制御下に維持されているリガンドの異常レベルに関連する疾患状態を意味する。

本明細書中で使用される「1つの共通リガンドに応答する複数個の受容体の中

からの特定のステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物」の表現は上記ステロイドまたはステロイド様ホルモン応答性疾患状態に関連する受容体サブタイプと、同一の受容体クラスの他のサブタイプもしくはサブファミリーとよりも有意に高度に相互作用する化合物、すなわち、その転写活性化性の調整において1つの受容体サブタイプ（またはサブファミリー）に対して優先的選択性をもつ化合物を意味する。リガンドと特異的受容体サブタイプ（またはサブファミリー）の間の相互作用に適用される「有意に高度」の用語は、標的疾患状態の処置において、同一の受容体クラスの他のサブタイプ（またはサブファミリー）によって誘導される経路の活性化の場合よりも有意に高い治療係数（すなわち効力対毒性比）を有するリガンドを意味する。治療化合物の毒性は、所望の受容体サブタイプ（またはサブファミリー）以外の受容体サブタイプ（またはサブファミリー）と治療化合物の非選択的相互作用によって起こる場合が多い。したがって、本発明は、ホルモン治療に通常伴う副反応の発生を劇的に減少させる手段を提供するものである。

ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのすべてのメンバーのDNA結合ドメインは類似し、66～68個のアミノ酸残基からなり、9個のシステインを包含する約20個の不变アミノ酸残基を有する。

スーパーファミリーのメンバーは、ヒトグルココルチコイド受容体（アミノ酸421～486）、エストロジエン受容体（アミノ酸185～250）、鉱質コルチコイド受容体（アミノ酸603～668）、ヒトレチノイン酸受容体 $\alpha$ 1（アミノ酸88～153）のような既知ステロイド受容体のDNA結合ドメインの部分である上記不变アミノ酸残基を含むタンパク質として同定することができる。スーパーファミリーメンバーのDNA結合ドメインの高度に保存されたアミノ酸は以下の通りである。

Cys - X - X - Cys - X - X - Asp\* - X -  
 Ala\* - X - Gly\* - X - Tyr\* - X - X -  
 X - X - Cys - X - X - Cys - Lys\* -  
 X - Phe - Phe - X - Arg\* - X - X - X -  
 X - X - X - X - X - (X - X -) Cys -  
 X - X - X - X - X - (X - X - X -) Cys -  
 X - X - X - Lys - X - X - Arg - X - X -  
 Cys - X - X - Cys - Arg\* - X - X -  
 Lys\* - Cys - X - X - X - Gly\* - Met

(配列番号: 1)

(式中, XはDNA結合ドメイン内の非保存アミノ酸を示し, 星印を付したアミノ酸残基はほぼ普遍的に保存されているが, 同定されたホルモン受容体の一部にその変異が見いだされている残基であり, またカッコで囲んだ残基は任意残基である(したがって, DNA結合ドメインは最小で66アミノ酸長であるが, 数個の付加的残基を含有することもできる)。

ステロイド/甲状腺ホルモンスーパーファミリーの受容体の典型的メンバーには, グルココルチコイド受容体, 鉱質コルチコイド受容体, プロゲステロン受容体, アンドロゲン受容体, ビタミンD<sub>3</sub>受容体等のステロイド受容体, それに加えてRAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ 等, さらにRXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ 等のようなレチノイド受容体, TR $\alpha$ , TR $\beta$ 等のような甲状腺ホルモン受容体, ならびにそれらの構造および性質によって, 上に定義されたスーパーファミリーのメンバーと考えられる他の遺伝子産物が包含される。オーファン受容体の例にはHNF 4 [たとえば, Sladekら, Genes & Development 4: 2353-2365 (1990) 参照], COUPファミリーの受容体 [たとえば, Miyajimaら, Nucleic Acids Research 16:11057-11074 (1988), Wangら, Nature 340:163-166 (1989) 参照。さらに Mlodzikら, Cell 60: 211-224 (1990) および Ladias ら, Science 251: 561-565 (1991) に記載されているCOUP様受容体およびCOUP同族体を包含する], ウルトラスピラクル受容体 [たとえば, Oro ら, Nature 347: 298-301 (1990) 参照], PPAR [たとえば, Dreyerら, Cell 68: 879-887 (1992) 参照] 等が包含される。

本明細書に述べるよう, GAL4タンパク質のDNA結合ドメインは, 本発

明においてオーファン受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体の同定, および複数個のステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質の中からの特定のステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物の同定に利用される. 酵母GAL4タンパク質のDNA結合ドメインはその少なくとも最初の74個のアミノ酸から構成される [たとえば Keeganら, *Science* 231: 699-704 (1986) 参照]. GAL4タンパク質の最初の90個またはそれ以上のアミノ酸を用いることが好ましく, 酵母GAL4の最初の147個のアミノ酸残基が現時点ではとくに好ましい.

本発明の実施に使用されるGAL4フラグメントはステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質内の多くの任意の位置に組み込むことができる. たとえば, GAL4DNA結合ドメインはステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質のアミノ末端に導入することが可能であり, またGAL4DNA結合ドメインはステロイド/甲状腺ホルモン受容体のネイティブなDNA結合ドメインを置換してもよく, またGAL4DNA結合ドメインはステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質のカルボキシ末端に導入されてもよく, また本技術分野の熟練者によれば容易に決定できる他の位置に導入することもできる. したがって, たとえば, 本質的にはGAL4のアミノ酸残基1~147と, さらに上記ステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質のリガンド結合ドメインから構成される (すなわち, 上記受容体のリガンド結合ドメインのみを含有し, そのDNA結合ドメインおよびそのアミノ末端ドメインは実質的に存在しない) 修飾受容体タンパク質を調製することができる.

本発明による同定方法は, 修飾受容体とレポータープラスミドを適当な宿主細胞中で試験化合物の存在下に培養する機能バイオアッセイ系の使用を包含する. 活性化された受容体-リガンド複合体の存在を決定するため, ついでレポーター遺伝子の転写の証明 (たとえば発現) がモニターされる. したがって機能バイオアッセイ系では2つのプラスミド, 「発現」プラスミドと「レポーター」プラスミドが利用される. 発現プラスミドは, オーファンステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質の所望の修飾型をコードするDNAを含有し, それを適当な宿主細胞内において発現できる任意のプラスミドとすることができます. レポーター

プラスミドは、操作性レポーター遺伝子に機能性に連結された操作性のG A L 4レスポンスエレメントを含有する任意のプラスミドとすることができる。

典型的なG A L 4 レスponsエレメントは、たとえば、Websterら、Cell 52: 169-178 (1988) に記載されている 17 MXのようなパリンドローム17-マー:

5'-CGGAGGACTGTCCCTCCG-3' (配列 I D番号: 5)

を含有するレスポンスエレメントならびにそれらの誘導体である。適当なレスポンスエレメントの他の例には、Hollenberg & Evans, Cell 55: 899-906 (1988) または Websterら, Cell 54: 199-207 (1988) に記載されているレスポンスエレメントが包含される。

典型的なレポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ (C A T) , ルシフェラーゼ (L U C) ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) 等を挙げることができる。典型的なプロモーターにはシミアンウイルス (S V) プロモーターまたはその修飾型 (たとえば $\Delta$  S V) , チミジンキナーゼ (T K) プロモーター, 乳癌ウイルス (M T V) プロモーターまたはその修飾型 (たとえば $\Delta$  M T V) 等が包含される [たとえば, Mangelsdorfら, Nature 345: 224-229 (1990), Mangelsdorfら, Cell 66: 555-561 (1991), Bergerら, J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 41: 733-738 (1992) 参照] . プラスミド p G M C A T , p G H C A T , p T K- G A L , 3- L U C ,  $\Delta$  M T V- G A L , 3- L U C ,  $\Delta$  M T V- G A L , 3- C A T 等は、操作性レポーター遺伝子に機能性に連結された操作性ホルモン応答性プロモーター／エンハンサーエレメントを含有するレポータープラスミドの例であり、したがって上述の機能バイオアッセイに用いることができる (これらのプラスミドの調製に関する詳細は例2参照) .

p G M C A Tにおいては操作性ホルモン応答プロモーター／エンハンサーエレメントはM T V L T Rであり, p G H C A Tにおいてはそれは増殖ホルモンプロモーターの機能性部分である. p G M C A TおよびG H C A Tの両者においては操作性レポーター遺伝子はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) の細菌性遺伝子である。

本明細書において「操作性レポーター遺伝子に機能性に連結された操作性レスポンスエレメント」の表現に用いられる「操作性」の語は、それぞれのDNA配

列（「G A L 4 レスポンスエレメント」および「レポーター遺伝子」の語によつて表される）が操作性であること、すなわちそれらの意図された目的のために作動することを意味し、「機能性」の語は2つのセグメントが連結されたのち、リガンドー受容体複合体によって適当に活性化されると、「G A L 4 レスポンスエレメント」が「点灯」または他の方法で活性化されたという事実の結果としてレポーター遺伝子が発現されることを意味する。

上述の機能バイオアッセイの実施に際しては、発現プラスミドとレポータープラスミドが適当な宿主細胞中にコトランスフェクトされる。トランスフェクトされた宿主細胞はついで、試験化合物がレポータープラスミドのG A L 4 レスポンスエレメントに操作性に連結されたプロモーターの活性化を起こすことができるかどうかを決定するために、試験化合物の存在下および不存在下に培養される。その後、トランスフェクトされ培養された宿主細胞がレポーター遺伝子配列の産物の誘導（すなわち存在）についてモニターされる。

本発明の実施に際しての使用が意図される機能バイオアッセイには、任意の細胞系が適当な「宿主」として使用できる。したがって、従来技術のアッセイ系の要件とは異なり、本発明の方法を実施する場合には受容体-陰性細胞を使用する必要はない。本発明の実施に使用される修飾受容体は試験細胞中においてG A L 4 レスポンスエレメントから転写を開始できる唯一の種であることから、試験細胞によるネイティブな受容体の発現はバックグランドレベルに寄与しない。したがって、本発明のバイオアッセイはきわめて選択的である。

本発明の実施に際して使用が意図される細胞には、トランスフォームされた細胞、トランスフォームされていない細胞、新生細胞、様々な細胞タイプの初代培養細胞等が包含される。本発明の実施に際して使用できる典型的な細胞には、シュナイダー細胞、C V - 1 細胞、H u T u 80細胞、F 9 細胞、N T E R A 2 細胞、N B 4 細胞、H L - 60 細胞、293 細胞、H e l a 細胞、酵母細胞等が包含される。機能バイオアッセイ系における使用に好ましい宿主細胞はC O S 細胞およびC V - 1 細胞である。C O S - 1 (C O Sと呼ぶ) 細胞はサルの腎臓細胞でありS V 40 T抗原 (T a g) を発現するが、C V - 1 細胞はS V 40 T a g を発現しない。C O S - 1 誘導系中のT a g の存在は導入された発現プラスミドを複製可

能にし、アッセイ期間中に產生される受容体の量の相対的増加を生じる。C V-1 細胞はそれらがとくに遺伝子トランスファー研究に便利で、感受性でかつ特徴が十分明らかにされた宿主細胞系を提供することから、現時点では好ましい。

上述の細胞（またはその分画）は生理学的に活性な化合物と接触させる場合、生理学的条件下に維持される。「生理学的条件」が約37°Cの温度での等張性、水性栄養培地であることは、本技術分野の熟練者には自明の通りである。

本発明の他の実施態様によれば、ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質のアンタゴニストをスクリーニングする方法において、

(i) ホルモン受容体アゴニストの転写活性化活性を阻害する能力の測定が求められている少なくとも1種の化合物をその濃度を上昇させて、および

(ii) 所望により、上記ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質またはその機能性修飾型に対する少なくとも1種のアゴニスト

を含有する試験細胞を培養し〔この場合上記試験細胞は(i) G A L 4のDNA結合ドメインを含有するステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質の修飾型またはその機能性修飾型を発現する外因性DNA、および(ii) レポーター遺伝子に操作性に連結されたG A L 4レスポンスエレメントを含有する〕、ついで

ホルモン受容体アゴニストによる転写の活性化を阻害する上記化合物の能力を指示する上記培養培地中における上記化合物の濃度の関数としての、上記細胞内における上記レポーター遺伝子の転写の証拠をアッセイすることからなる方法が提供される。

このような培養に使用される培地には試験される受容体に対するアゴニストを包含させてもよく、また受容体は構成的であってもよく（すなわち、活性化のためにアゴニストの存在を必要としない）、またこのような試験に使用される培地には固定濃度のアゴニストを添加することもできる。

本発明の上述のアッセイは、バックグラウンドが低く、動的範囲が広い。

本発明のさらに他の実施態様によれば、細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体に変換できるか、または第二の化合物の、細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを行うことができるか、または細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うこ

とができる特徴とする生物活性化合物を同定する方法において、

(1) 細胞または細胞分画を、上記の生物活性化合物と生理学的条件下に接触させ、

(2) 細胞、細胞分画および／または上記接触が行われた培地を分画化し、ついで、

(3) 上記各分画を、上述のGAL4受容体キメラ構築体をコードするDNAおよびレポーターをコードするDNAに操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と上記各分画を培養する機能アッセイに付し、レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体-リガンド複合体の存在を決定する、

ことからなる方法が提供される。

細胞内受容体に対するリガンドおよびリガンド前駆体の例は上に掲げた。細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができる化合物には、受容体と化合物の直接相互作用が関与しない別の生化学的経路によって、受容体のアクティベーターとして作用する化合物が含まれる。このような化合物の例には、ドパミン、脂肪酸、クロフィブリン酸、外来異物等がある。

本発明の別の実施態様に関して上述したように、本発明のこの実施態様の実施に際しても広範囲の多様な細胞の使用が想定される。

本発明のこの実施態様における使用が意図される細胞分画には、多様な細胞下分画たとえば、核分画、サイトゾル分画、膜分画等が含まれる。

上述の接触が行われる細胞、細胞分画および／または培地の分画化は、本技術分野の熟練者によれば容易に決定できる様々な方法で実施できる。たとえば、発酵肉汁は水性および／または有機培地に抽出し、多様な物理的分離技術、たとえば標準カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分離、超遠心分離(たとえば、密度勾配または等密度バンド法)、薄層クロマトグラフィー(TLC)等によってさらに分画化、精製される。

本発明の同定方法には機能バイオアッセイ系の使用が含まれ、この場合、上述の分画は上述のGAL4受容体キメラ構造体をコードするDNAおよびレポーターコードDNAに操作性に連結しているGAL4レスポンスエレメントを含有

する宿主細胞と培養され、活性化された受容体-リガンド複合体の存在を決定するため、レポーター遺伝子産物の発現がモニターされる。したがって、機能バイオアッセイ系は2種のプラスミド、すなわち「発現」プラスミドおよび「レポーター」プラスミドを使用する。発現プラスミドは、適当な宿主細胞内で上述のGAL4-受容体キメラ構造体（またはその変異体）を含有し、それを発現できる任意のプラスミドである。レポータープラスミドは操作性レポーター遺伝子に機能性に連結された操作性GAL4応答性プロモーター／エンハンサー要素を含有する任意のプラスミドである。

本発明のこの実施態様の実施に際しての使用に適当な典型的レポーター遺伝子は本発明の別の実施態様に関連して上述した通りである。

細胞内受容体すなわちステロイド／甲状腺ホルモンスーパーファミリー受容体のメンバーに対するリガンドの機能を好ましい形態で測定するために機能バイオアッセイ系を用いる場合には、プラスミドにはamp遺伝子のような選択的マークを担わせることになる。さらに、好ましい形態においては、レポータープラスミドは適当なホルモン応答性プロモーター／エンハンサー要素たとえば、MTVLTRまたは増殖ホルモンプロモーターの機能性部分を含有させる。

SV40複製起点（ori）を含有する発現プラスミドはSV40Taqを発現する任意の宿主細胞内において高コピーニュ数に増殖することができる。したがって、SV40"ori"を有する発現プラスミドは、COS細胞内では複製できるが、CV-1細胞内では複製できない。高コピーニュ数によって得られる発現の増大は望ましいものではあるが、それは「シストrans」バイオアッセイ系の操作性に必須ではない。バイオアッセイに通常用いられる発現ベクターは一般的にきわめて効率的であるから、アッセイは実際上任意の宿主内で実施できる。

したがって、本発明の他の実施態様に関して上述したように、任意の細胞系が本発明のこの実施態様における使用が意図される機能バイオアッセイに対し、適当な「宿主」として使用することができる。

上述の機能バイオアッセイに基づいて、ステロイドまたはステロイド様化合物による受容体の活性化（またはアゴニストの存在下でのこのような活性化の試験化合物による阻害）を調べることができる。

本発明のさらに他の実施態様によれば、生物活性化合物の、

(A) 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体、または、

(B) 第二の化合物の細胞内受容体（単数または複数）に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを促進する種、または

(C) 細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができる種、

への変換を促進できる細胞系を同定する方法において、

(1) 細胞をその細胞の生存度の維持に適当な条件下で生物活性化合物と接触させ、

(2) 細胞および細胞が保持される培地を分画化し、

(3) 上記分画のそれぞれを、各分画が上述のG A L 4受容体キメラ構築体をコードするDNA、およびレポーターコードDNAに操作性に連結したG A L 4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と培養される機能バイオアッセイに付し、活性化された受容体-リガンド複合体の存在を測定するためにレポーター遺伝子の発現をモニターし、ついで

(4) 上記生物活性化合物の、上記機能バイオアッセイにおける機能性産物への変換を促進する細胞系を同定する、

ことからなる方法が提供される。

本発明のさらに他の実施態様によれば、生物活性化合物の、

(A) 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体、または、

(B) 第二の化合物の、細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを促進する種、または

(C) 細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができる種、

への変換を促進できる酵素または非酵素性活性を同定する方法において、

(1) 生物活性化合物を所望の変換を促進するのに適当な条件に付し、

(2) 工程(1)の反応生成物を、各分画が上述のG A L 4受容体キメラ構築体をコードするDNA、およびレポーターコードDNAに操作性に連結されたG A L 4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と培養される機能バイオアッ

セイに付し、活性化された受容体-リガンド複合体の存在を測定するためにレポーター遺伝子の発現をモニターし、ついで、

(3) 上記生物活性化合物の、上記機能アッセイにおいて所望の活性を与える機能性産物への変換を促進する条件を同定する、  
ことからなる方法が提供される。

生物活性化合物の所望の変換を促進するのに適当な条件には、所望の活性を含む可能性のある細胞分画と接触させること、生物活性化合物を温度の変動、pH変化、紫外線照射、または生物活性化合物の活性の修飾を行うことができる可能性をもつ他の任意の化学的または物理的暴露に付すことが包含される。

次に本発明を、以下の非限定的実施例を参照することによって、さらに詳細に説明する。

#### 例 1

##### G A L 4-受容体融合タンパク質の調製

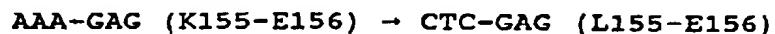
G A L 4-受容体融合タンパク質の発生に有用な基本ベクターは、p CMX-G A L 4と呼ばれる(配列番号: 2参照)。このベクターはG A L 4 DNA結合ドメインと、それに続くクローンニングに有用なポリリンカー配列をコードする。親の発現ベクターp CMXは、Umesono ら、Cell 65: 1255-1266 (1991)に記載されており、p CMX-G A L 4のG A L 4部分は、Sadowski & Ptashne, Nucleic Acids Res. 17:7539 (1989)に記載されているプラスミドp S G 424に由来する。

一般に、G A L 4-受容体リガンド結合ドメイン融合体はG R-R A Rキメラのような変異受容体c DNAクローンを利用して調製される[たとえばGiguereら、Nature 330: 624-629 (1987)参照]。これらの変異受容体c DNAはそのDNA結合ドメインの末端に、Giguere ら(前出)に記載されているように、共通のX h o I部位をコードする。このために、適合するS a l I部位をポリリンカーパ配列中にコードする新規なp CMX-G A L 4ベクターを調製した(G A L 4配列中にはX h o I部位がある) :

S a l I部位: G' T C G A C

## X h o I 部位 : C' T C G A G

これは、受容体リガンド結合ドメインのG A L 4 DNA結合ドメインへの効率的なトランスファーを可能にする。この方法により、多数のキメラ種が発生されている。たとえば、G A L 4 - h R A R  $\alpha$ 、G A L 4 - h T R  $\beta$ 、G A L 4 - h G R、G A L 4 - h E R R 1、G A L 4 - h E R R 2、G A L 4 - h X R 2 (h X R 2 は現在係属中の出願一連番号第07/761, 068に記載されている)、G A L 4 - m X R 5 (m X R 5 は現在係属中の出願一連番号第07/761, 068に記載されている)、G A L 4 - h V D R、G A L 4 - h R X R  $\alpha$  等である。たとえば、h R A R  $\alpha$  c D N A は、以下のように、唯一のX h o I 部位をコードするように変異させた (Giguere ら、前出参照)。



この変異させたR A R  $\alpha$  c D N A をついでX h o I およびB a m H I で消化し、p C M X - G A L 4 のS a l I - B a m H I 消化物にライゲートし (配列番号 : 4 に掲げた「新しい」リンカーを含有し、配列番号 : 4 に掲げたリンカーは配列番号 : 2 に掲げた構築体中にその残基479 ~ 532 の代わりに挿入される)、関連部分に



(式中、「D B D」はD N A 結合ドメイン、「L B D」はリガンド結合ドメインを意味する) の配列を有する構築体を製造した。

上に言及したタイプの変異体がG A L 4 - 含有キメラ体の構築に利用できない場合には、単に関心受容体のD N A 結合ドメインの下流の任意の便利な制限酵素部位 (すなわち、D N A 結合ドメインの保存されているG l y - M e t 残基の下流の最初の約30個のアミノ酸残基内、すなわち、配列番号 : 1 に示した最後の2個の残基の30個残基以内) を探してそのカルボキシ端末配列を利用することができる。

別法として、P C Rベースの突然変異誘発を利用して所望の制限部位をD N A セグメントに付加することもできる。たとえばステロイド/甲状腺ホルモンスーパーファミリー受容体の任意のメンバーのリガンド結合ドメインに対して相補性

のプライマーを設計することができる。このようなプライマーは、PCRにより、与えられた受容体の所望部分を増幅させることができる。プライマーの末端に所望の制限部位を付加することにより、PCRによって合成された各コピーが、その末端にそのような制限酵素部位をもつことを確実にすることができます [Schaarf, Cloning with PCR. In: PCR Protocols (Innis ら編), Academic Press Inc. (SanDiego, CA) 84-91 (1990)]。続いて、フラグメントは、両酵素で消化し、同一のまたは適合性の酵素で消化されたpCMX-GAL4にライゲートすることができる。

すなわち、たとえば、ニワトリRAR $\beta$ のリガンド結合ドメインは、アミノ酸147～154および447～452に相補性のプライマーによりPCRを用いて増幅させることができる。Sal I部位は5'末端に、またNhe I部位は3'末端に付加させることができる。増幅後、フラグメントは、Sal IおよびNhe Iで消化し、ついでpCMX-GAL4 (Sal IおよびNhe Iで予め消化。配列番号: 4に掲げたポリリンカー包含pCMX-GAL4nを使用) にライゲートすることができる。

## 例2

### レポーター構築体の調製

以下の実施例においては、様々なレポーター構築体が用いられる。それらは以下のようにして調製される。

TK-LUC: MTV-LTRプロモーター配列を Hind IIIおよびXho I消化によって Hollenberg & Evans, Cell 55: 899-906 (1988)に記載のMTV-LUCプラスミドから取り出し、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子プロモーター [Luckow & Schutz, Nucleic Acids Res. 15: 5490 (1987) に記載されているプラスミドpBLCAT2から単離される転写開始部位mに対して-105～+51] のHind III-Xho Iフラグメントでクローン化し、親の構築体TK-LUCを発生させた。

pTK-TREp2-LUC: レチノイン酸受容体 (RAR) 結合部位をコードする二本鎖パリンドローム甲状腺ホルモンレスポンスエレメント (TREp) オリゴヌクレオチドの2つのコピーを、TK-LUCのTKプロモーターの上流

Hind III部位にクローン化した。

pTK-GALp3-LUC : GAL4結合部位をコードする二本鎖17MXオリゴヌクレオチドの3つのコピーを, TK-LUCのTKプロモーターの上流に Hind III部位でクローン化した。

△MTV-GALp3-CAT : GAL4結合部位をコードする二本鎖17MXオリゴヌクレオチドの3つのコピーを, Hollenberg & Evans, 前出に記載されている△MTV-CATプラスミド中のHind III部位にクローン化した。

△MTV-GALp3-LUC : GAL4結合部位をコードする二本鎖17MXオリゴヌクレオチドの3つのコピーを, Hollenberg & Evans, 前出に記載されている△MTV-LUCプラスミドのHind III部位にクローン化した。△MTV-LUCプラスミドは, Hollenberg & Evans, 前出に記載されているように, もはやホルモンに応答しない突然変異MTV-LTRプロモーターをコードする

CMX- $\beta$ GAL : 大腸菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のコード配列を, プラスミドpCH110 [Hallら, J.Mol.Appl.Genet. 2: 101-109 (1983) 参照] から Hind IIIおよびBamHIによる消化で単離し, pCMX真核細胞発現ベクターにクローン化した (Umesono ら, 前出参照)。

### 例3

#### 受容体選択性アゴニストのスクリーニングアッセイ

CV-1細胞を, 96ウェルプレート中で, CMX-GAL-hRAR $\alpha$ およびtk-gal, x3-1ucによって, コトランスフェクトした。96ウェルあたりのDNAの通常量は, 1 $\mu$ g のCMX-GAL-hRAR $\alpha$ , 5 $\mu$ g のtk-gal, x3-1uc, 4 $\mu$ g のCMX- $\beta$ GALである。通常, トランスフェクションは三重に実施する。ついでプレートを37°Cで一夜インキュベートする。

細胞を新鮮培地で2回洗浄する。アゴニストの系列稀釀の1つの濃度を含有する新鮮培地を各ウェルに添加する。通常のアゴニスト稀釀系列は  $10^{-5}$ M~ $10^{-1}$  Mの範囲とする。各アゴニストについて溶媒対照を設ける。細胞は37°Cで1~2日間インキュベートする。

細胞を緩衝食塩溶液で2回濯ぐ。ついで 200 $\mu$ l の溶解緩衝液を添加して細胞

をインシトウで溶解させる。室温で30分間インキュベートしたのち、細胞溶解物

の  $40 \mu\text{l}$  アリコートをルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼトランスフェクション対照用に96ウェルプレートに移す [Heymanら, Cell 68: 397-406 (1992) 参照]。

データは、相対光単位 (RLU) /  $\beta$ -ガラクトシダーゼの O.D. 単位/分で表した。三重実験の結果を各濃度について平均し、正規化RLU対アゴニスト用量または誘導倍率対アゴニスト用量としてプロットする。

特定の受容体に対するアゴニストの選択性は、その受容体の活性化を他の類似受容体を用いて同一アゴニストによって認められる活性化と比較して測定する。特定のアゴニストによって誘発される活性化を、同一の受容体で最大濃度の全トランスレチノイン酸によって誘発される活性化の百分率として表すのが有用な場合が多い。

本例は、本発明の方法が、多数の化合物および/または細胞系について、リガンドの存在または試験細胞系が培地成分から機能性リガンドを産生させる能力を測定するためのスクリーニングに容易に適用できることを証明する。

#### 例4

##### 各種hRAR $\alpha$ 構築体の用量反応

エフェクタープラスミド、レポータープラスミドおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ対照プラスミドを、CV-1細胞に、約1:5.4の比で、リポソーム仲介法により、DOTAP (Boehringer Manheim) を製造業者の説明書に従って用い無血清培地 (たとえば Life Technologies, Gaithersberg, MD 製Opti-MEM) 中でコトランスフェクトする。約18時間後、細胞を新鮮なOpti-MEMで2回洗浄し、全トランスレチノイン酸を培地に図3に示す最終モル濃度になるように添加する。24時間インキュベートしたのち、細胞をリン酸緩衝食塩溶液 (pH 7.2) で灌ぎ、溶解させる。アリコートについてルシフェラーゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をアッセイする。ルシフェラーゼ活性は1分間のインキュベーションあたりの $\beta$ -ガラクトシダーゼの光学密度単位に正規化する。

データは、溶媒単独でインキュベートした同一構築体に対する誘導倍率として

表3に示す、用いられた受容体：レポーターの組合せは以下の通りである。

CMX-GAL-hRAR $\alpha$ 1 (hRAR $\alpha$ のリガンド結合ドメインはGAL

4のアミノ酸 1~173 に融合) と pTK-GAL p3-LUC;

RS-GGR (ヒトグルココルチコイド受容体 $\alpha$ のアミノ末端とDNA結合ドメインをhRAR $\alpha$ のリガンド結合ドメインに融合) とMTV-LUC;

RS-GRR (ヒトグルココルチコイド受容体 $\alpha$ のアミノ末端ドメインをhRAR $\alpha$ のDNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメインに融合) と pTK-TRE p2-LUC; および

CMX-hRAR $\alpha$ 1 と pTK-TRE p2-LUC.

図3を見れば、本発明のキメラ受容体はアゴニスト型アッセイにおいて、非修飾受容体または従来技術で使用されているキメラ受容体（たとえば、GRRまたはGGR）に比較して、はるかに高い応答性を示すことが明らかである。

本発明をその一部の好ましい実施態様を参照しながら詳細に説明したが、修飾および変化は記載され請求された精神および範囲内に包含されることを理解すべきである。

#### 配列の要約

配列番号：1は、ステロイド/甲状腺ホルモンスーパーファミリーの受容体のメンバーのDNA結合ドメインのコンセンサスアミノ酸配列である。

配列番号：2は、GAL4-受容体融合タンパク質の調製に有用なベクターの核酸配列（および推定アミノ酸配列）であって、本発明の実施に有用なGAL4 DNA結合ドメインをコードする典型的なセグメントを包含する。

配列番号：3は、配列番号：2の核酸配列の推定アミノ酸配列である。

配列番号：4は、本発明のキメラ構築体の調製に有用なリンカーの核酸配列である。

配列番号：5は、本発明の実施に有用なGAL4レスポンスエレメントの核酸配列である。

### 配列表

配列番号：1

配列の長さ: 71 アミノ酸

### 配列の型：アミノ酸

### トポロジー：直鎖状

### 配列の種類：タンパク質

### フラグメント型：N末端フラグメント

### 配列の特徴：

### 特徴を表す記号: Modified-site

存在位置: 37, 38, 45, 47

他の情報：／ラベル＝任意

／注=「これらの残基は任意残基である。したがって、DNA結合ドメインは最小66アミノ酸長であるが、数個の付加的残基を含有してもよい

## 配列の特徴：

### 特徴を表す記号: Region

存在位置 : 7, 9, 11, 13, 22, 27, 62, 65, 70

他の情報：／ラベル=保存

／注=「これらの残基はほとんど普遍的に保存されているが、一部の同定されているホルモン受容体に変化が見出されている

## 配列

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Asn Xaa Ala Xaa Gly Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Cys Xaa Xaa Cys Lys Xaa Phe Phe Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys  
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Arg Xaa Xaa  
50 55 60

Lys Cys Xaa Xaa Xaa Gly Met  
65 ! 70

配列番号：2

配列の長さ：546 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：両者

配列の種類：DNA (ゲノム)

ハイポセティカル配列：なし

アンチセンス：なし

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：35 . . 532, 536 . . 544

配列

GGGAGACCCA AGCTTGAAGC AAGCCTCTG AAAG ATG AAG CTA CTG TCT TCT	52
Met Lys Leu Leu Ser Ser	1 5
ATC GAA CAA GCA TGC GAT ATT TGC CGA CTT AAA AAG CTC AAG TGC TCC	100
Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser	10 15 20
AAA GAA AAA CCG AAG TGC GCC AAG TGT CTG AAG AAC AAC TGG GAG TGT	148
Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys	25 30 35
CGC TAC TCT CCC AAA ACC AAA AGG TCT CCG CTG ACT AGG GCA CAT CTG	196
Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu	40 45 50
ACA GAA GTC GAA TCA AGG CTA GAA AGA CTG GAA CAG CTA TTT CTA CTG	244
Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu	55 60 65 70
ATT TTT CCT CGA GAA GAC CTT GAC ATG ATT TTG AAA ATG GAT TCT TTA	292
Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu	75 80 85
CAG GAT ATA AAA GCA TTG TTA ACA GGA TTA TTT GTA CAA GAT AAT GTG	340
Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val	90 95 100
AAT AAA GAT GCC GTC ACA GAT AGA TTG GCT TCA GTG GAG ACT GAT ATG	388
Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met	105 110 115
CCT CTA ACA TTG AGA CAG CAT AGA ATA AGT GCG ACA TCA TCA TCG GAA	436
Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu	120 125 130
GAG AGT AGT AAC AAA GGT CAA ACA CAG TTG ACT GTA TCG CCG GAA TTC	484
Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Pro Glu Phe	135 140 145 150
CCG GGG ATC CGT CGA CGG TAC CAG ATA TCA GGA TCC TGG CCA GCT AGC	532
Pro Gly Ile Arg Arg Tyr Gln Ile Ser Gly Ser Tryp Pro Ala Ser	155 160 165
TAG GTA GCT AGA GG	546
Val Ala Arg	

配列番号：3

配列の長さ：169 アミノ酸

### 配列の型：アミノ酸

### トポロジー：直鎖状

### 配列の種類：タンパク質

## 配列

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu  
 20 25 30  
 Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro  
 35 40 45  
 Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu  
 50 55 60  
 Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu  
 85 90 95  
 Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala  
 100 105 110  
 Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser  
 115 120 125  
 Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu  
 130 135 140  
 Thr Val Ser Pro Glu Phe Pro Gly Ile Arg Arg Arg Tyr Gln Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Trp Pro Ala Ser Val Ala Arg  
 165

配列番号：4

配列の長さ：57 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (ゲノム)

ハイポセティカル配列：なし

アンチセンス：なし

配列

CCGGAATTCTG GTACCGTCGA CGATATCCCC CGGGCTGCAG GATCCTGGCC AGCTAGC 57

配列番号：5

配列の長さ：17 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (ゲノム)

ハイポセティカル配列：なし

アンチセンス：なし

配列

CGGAGGGACTG TCCTCCG

【図1】

図1A

HindIII | - -> GAL4配列開始  
 1 GGGAGACCCAAAGCTTGAAGCAAGCCTCCCTGAAAGATGAAAGCTACTGTCTATCGAACAA  
 M K L L S S I E Q 9

SphI  
 61 AGCATGCCGATATTGCCGACTTAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAAACCGAAGTGGC  
 A C D I C R L K L K C S K E K P K C A 29

121 CAAGTGTCTGAAGAACAACTGGGAGTGTGCTACTCTCCAAACCAAAAGGTCTCCGCT  
 K C L K N N W E C R Y S P K T K R S P L 49

181 GACTAGGGCACATCTGACAGAAAGTGGAAATCAAGGCTAGAAAGACCTTACAGCTATTCT  
 T R A H L T E V E S R L E R L E Q L F L 69

XbaI  
 241 ACTGATTCTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTGAAAATGGATTCTTACAGGATAT  
 L I F P R E D L D M I L K M D S L Q D I 89

【図1】

図1B

301 AAAAGCATTGTAACAGGATTTGTACAAAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTACAGA 109  
 K A L L T G L F V Q D N V N K D A V T D

361 TAGATTGGCTCAGTGGAGACTGATATGCCCTCTAACATGAGACAGGCATAAGATAAGTGC 129  
 R L A S V E T D M P L T L R Q H R I S A

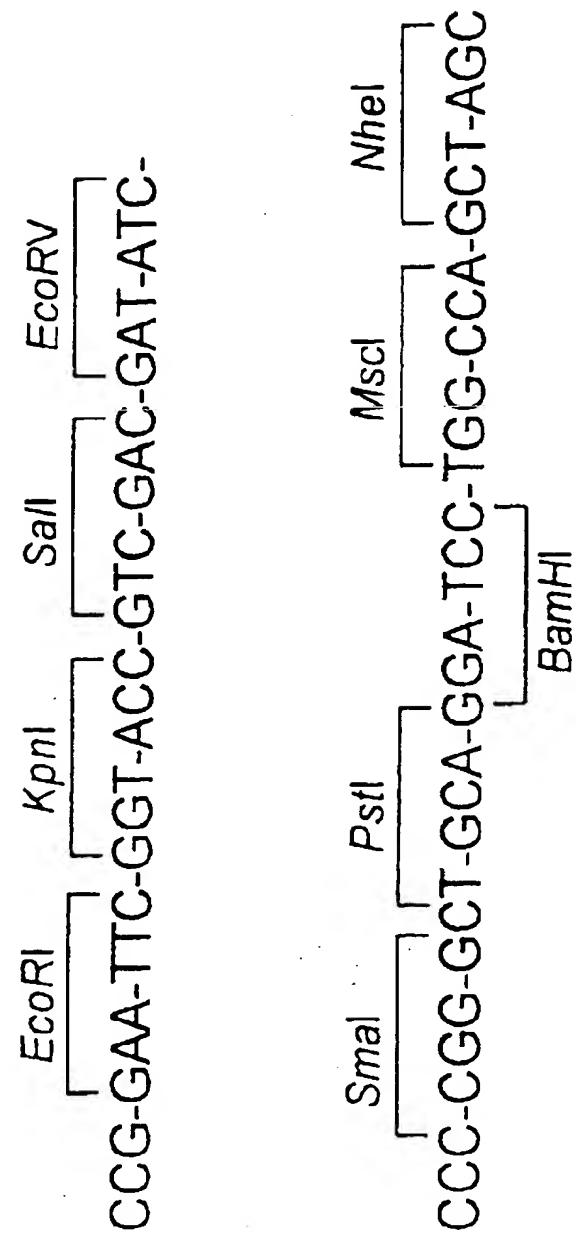
421 GACATCATCATCGGAACAGAGACTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGGTTGACTGTATGCCGGA 149  
 T S S S E E S S N K G Q R Q L T V S P E  
 ↓  
 ECORI SmaI BamHI Sall KpnI EcoRV BamHI NheI

481 ATTCCCCGGGATCCGTCACGGTACCGATATCAGGATCCTGGCCAGCTAGCTAGGTAGC 169  
 F P G I R R Y Q I S G S W P A S \* V A

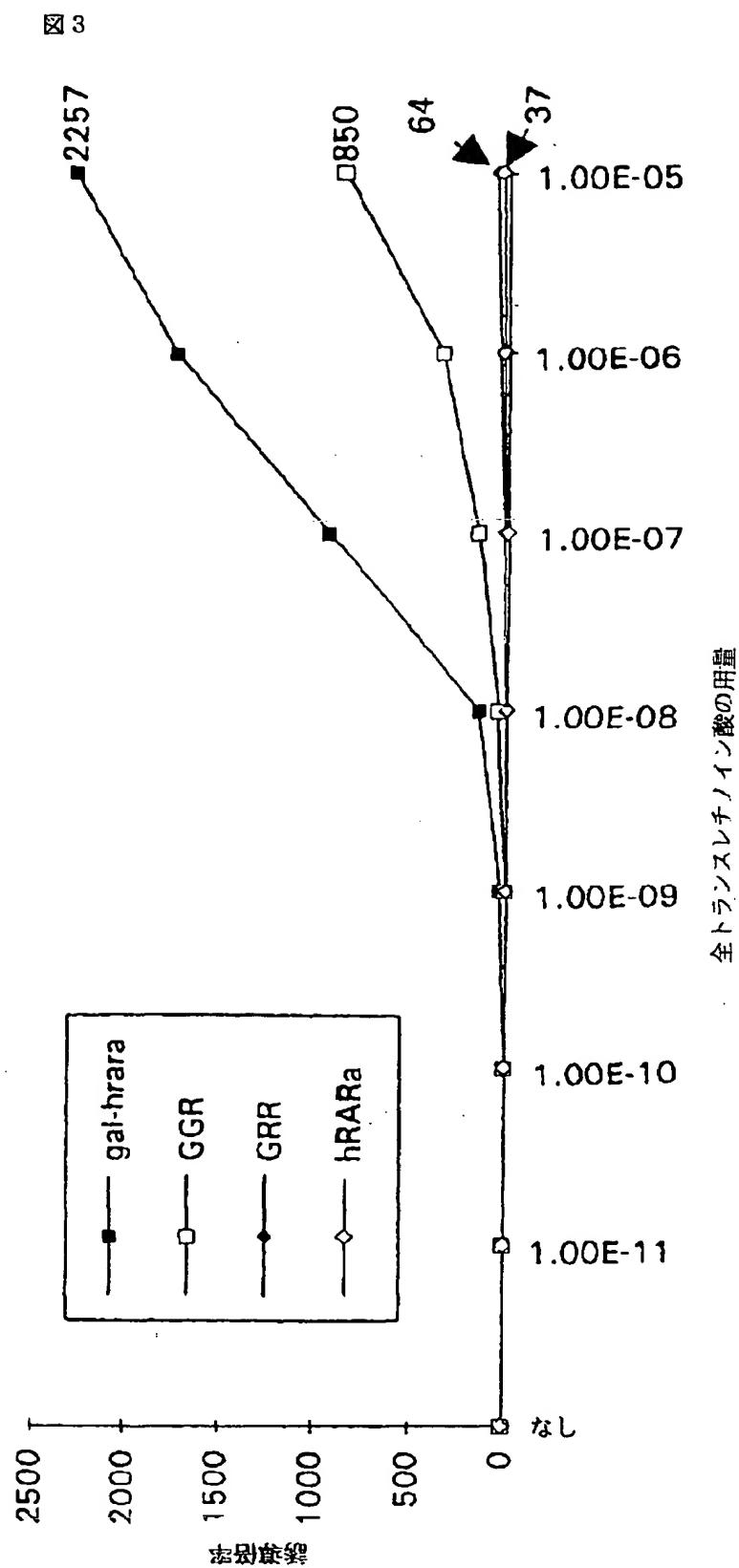
541 TAGAGG  
 R

【図2】

図2



【図3】



## 【手続補正書】

【提出日】 1996年8月19日

## 【補正内容】

『

## 請求の範囲

1. ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのオーファンメンバーに対するリガンドもしくはリガンド前駆体を決定する方法において，

上記オーファンメンバーの修飾型を含む細胞をそのオーファンメンバーに対する推定リガンドと接触させ，この場合，上記オーファンメンバーの上記修飾型はGAL4のDNA結合ドメインを上記オーファンメンバーに付加することによって生成され，また上記細胞はレポーター遺伝子に操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有し，ついで，

レポーター遺伝子産物の発現をモニターする，  
ことからなる方法.

2. GAL4のDNA結合ドメインはGAL4のアミノ酸残基 1～147 からなる「請求項1」に記載の方法.

3. GAL4のDNA結合ドメインはオーファンメンバーのアミノ末端に付加される「請求項1」に記載の方法.

4. 共通のリガンドに応答する複数個のステロイド／甲状腺ホルモン受容体の中から1つの特異的ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する方法において，

GAL4のDNA結合ドメインを上記複数個の受容体タンパク質それぞれに付加して，複数個の修飾受容体タンパク質を生成させ，

上記の修飾受容体タンパク質の1つを含有する細胞を個々に，上記修飾受容体タンパク質に対する推定選択的リガンドと，上記複数個の修飾受容体タンパク質のすべてのメンバーが個々に接触を受けるまで接触させ，この場合，上記細胞はレポーター遺伝子に操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有し

—

レポーター遺伝子産物の発現をモニターし，ついで，

共通のリガンドに応答する上記複数個の受容体の中から1つの特異的ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質に選択的な化合物を同定する、ことからなる方法。

5. 上記複数個の受容体タンパク質は共通のリガンドに応答する受容体の多重サブタイプからなる「請求項4」に記載の方法。

6. G A L 4のDNA結合ドメインはG A L 4の少なくとも最初の74個のアミノ末端アミノ酸残基からなる「請求項4」に記載の方法。

7. G A L 4のDNA結合ドメインは受容体タンパク質のアミノ末端に導入される「請求項4」に記載の方法。

8. ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質のアンタゴニストをスクリーニングする方法において、

(i) ホルモン受容体アゴニストの転写活性化活性を阻害する能力の測定が求められている少なくとも1つの化合物の濃度を上昇させ、および

(ii) 任意に、上記ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質もしくはその機能性修飾型に対する少なくとも1つのアゴニスト、を含有する試験細胞を培養し、ここで、上記試験細胞は (i) G A L 4のDNA結合ドメインを含有するステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質の修飾型またはその機能性修飾型を発現する外因性DNAおよび本来の受容体タンパク質の本来のDNA結合ドメイン、ならびに (ii) レポーター遺伝子に操作性に連結されたG A L 4レスポンスエレメントを含有し、ついで、

ホルモン受容体アゴニストによる転写の活性化を阻害する上記化合物の能力を指示する上記培養培地中の上記化合物の濃度の関数としての上記細胞内における上記レポーター遺伝子の転写の証明をアッセイする、

ことからなる方法。

9. ステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質をホモダイマー形成可能にする方法において、G A L 4のDNA結合ドメインを上記受容体タンパク質に付加することからなる方法。

10. G A L 4のDNA結合ドメインはG A L 4の少なくとも最初の74個のアミ

ノ末端アミノ酸残基からなる「請求項9」に記載の方法.

11. G A L 4 の D N A 結合ドメインは受容体タンパク質のアミノ末端に導入される「請求項9」に記載の方法.

12. 細胞内受容体に対するリガンドもしくはリガンド前駆体に変換できるか,

または第二の化合物の, 細胞内受容体のリガンドもしくはリガンド前駆体へのトランسفォーメーションを行うことができるか, または細胞内受容体のその活性型へのトランسفォーメーションを行うことができる特徴とする生物活性化合物を同定する方法において,

(1) 細胞または細部分画を上記生物活性化合物と生理学的条件下において接觸させ,

(2) 細胞, 細胞分画および/または上記接觸が行われた培地を分画化し, そして

(3) 上記各分画を, 酵母G A L 4 タンパク質のD N A 結合ドメインが付加されたステロイド/甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーからなるキメラ受容体をコードするD N A, およびレポーターコードD N Aに操作性に連結されたG A L 4 レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と各分画を培養する機能アッセイに付し, レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体-リガンド複合体の存在を測定する,

ことからなる方法.

13. 生物活性化合物の,

(A) 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体, または,

(B) 第二の化合物の, 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランسفォーメーションを促進する種, または,

(C) 細胞内受容体のその活性型へのトランسفォーメーションを行うことができる種,

への変換を促進できる細胞系を同定する方法において,

(1) 細胞をその細胞の生存度の維持に適当な条件下に生物活性化合物と接觸させ,

(2) 細胞および細胞が保持された培地を分画化し、  
 (3) 上記各分画を、酵母GAL4タンパク質のDNA結合ドメインが付加されたステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーからなるキメラ受容体をコードするDNA、およびレポーターコードDNAに操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞

と各分画を培養する機能アッセイに付し、レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体－リガンド複合体の存在を測定し、

(4) 上記生物活性化合物の、上記機能バイオアッセイにおいて機能性な産物への変換を促進する細胞系を同定する、  
 ことからなる方法。

14. 生物活性化合物の、

(A) 細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体、または、  
 (B) 第二の化合物の、細胞内受容体に対するリガンドまたはリガンド前駆体へのトランスフォーメーションを促進する種、または  
 (C) 細胞内受容体のその活性型へのトランスフォーメーションを行うことができる種、  
 への変換を促進できる酵素または非酵素活性を同定する方法において、  
 (1) 生物活性化合物を所望の変換を促進するために適当な条件に付し、  
 (2) 工程(1)の反応生成物を、酵母GAL4タンパク質のDNA結合ドメインが付加されたステロイド／甲状腺ホルモン受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーからなるキメラ受容体をコードするDNA、およびレポーターコードDNAに操作性に連結されたGAL4レスポンスエレメントを含有する宿主細胞と各分画を培養する機能バイオアッセイに付し、レポーター遺伝子の発現をモニターして活性化された受容体－リガンド複合体の存在を決定し、  
 (3) 上記生物活性化合物の、上記機能アッセイにおいて所望の活性を与える機能性の産物への変換を促進する条件を同定する、  
 ことからなる方法。』

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US94/14426

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : G01N 33/566; C12P 21/00; C12Q 1/00; C12N 15/00, 1/20  
US CL : 436/501; 435/69.1, 252.3, 7.2, 69.7, 172.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 436/501; 435/69.1, 252.3, 7.2, 69.7, 172.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

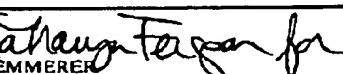
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG - Biotech Files

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 90, issued January 1993, G. Allenby et al, "Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids", pages 30-34, see entire document.	1-10 ----- 11-19
Y	Cell, Volume 54, issued 15 July 1988, N. J. G. Webster et al, "The Hormone Binding Domains of the Estrogen and Glucocorticoid Receptors Contain an Inducible Transcription Activation Function", pages 199-207, see entire document.	1-19

<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/>	See patent family annex.
*	Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier document published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 MARCH 1995	06 APR 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer  ELIZABETH C. KEMMERER
Faxsimile No. (703) 305-3230	Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/14426

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EMBO Journal, Volume 8, Number 5, issued 1989, N. J. G. Webster et al, "The transcriptional activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded in a single exon", pages 1441-1446, see entire document.	1-19
Y	Molecular Endocrinology, Volume 7, Number 4, issued 1993, G. E. Folkers et al, "The Retinoic Acid Receptor- $\beta$ 2 Contains Two Separate Cell-Specific Transactivation Domains, at the N-Terminus and in the Ligand-Binding Domain", pages 616-627, see entire document.	1-19
Y	Gene, Volume 131, issued 1993, J. F. Louvion et al, "Fusion of GAL4-VP16 to a steroid-binding domain provides a tool for gratuitous induction of galactose-responsive genes in yeast", pages 129-134, see entire document.	1-19
Y	Cell, Volume 68, issued 24 January 1992, R. A. Heyman et al, "9-Cis Retinoic Acid Is a High Affinity Ligand for the Retinoid X Receptor", pages 397-406, see entire document.	1-19
Y	Science, Volume 240, issued 13 May 1988, R. M. Evans, "The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily", pages 889-895, see entire document.	1-19
A, P	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 91, issued August 1994, Y. Wang et al, "A regulatory system for use in gene transfer", pages 8180-8184, see entire document.	1-19
A, P	Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Volume 9, issued 1994, N. Jausons-Loffreda et al, "Chimeric Receptors as a Tool for Luminescent Measurement of Biological Activities of Steroid Hormones", pages 217-221, see entire document.	1-19

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I  
G 0 1 N 33/53 0276-2 J G 0 1 N 33/532 Z  
33/532 9162-4 B C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72) 発明者 ウメソノ, カズヒコ  
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア  
州ラ ジョラ, プロスペクト ストリート  
1295, スウィート シー

(72) 発明者 プラムバーグ, ブルース  
アメリカ合衆国 92122 カリフォルニア  
州サン ディエゴ, ナンバー 122, レボ  
ン ドライブ 3435

(72) 発明者 ランガラジャン, プンディ エヌ.  
インド国 560 079 バンガロール, バサ  
ウエスワラナガ, セブンス エイ メイ  
ン, ナンバー 111